

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 24520091152978

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

闽南人群精氨酸酶 rs2781666 G/T 基因多态性 与动脉硬化闭塞症相关性研究

Association of rs2781666 G/T polymorphism of arginase I
gene with Arteriosclerosis obliterans in southern Fujian
population

刘青

指导教师姓名: 李昭辉

专 业 名 称: 外 科 学

论文提交日期: 2012 年 4 月

论文答辩日期: 2012 年 5 月

论文授予日期: 2012 年 5 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 4 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☒ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

缩写词.....	1
中文摘要.....	2
英文摘要... ..	3
绪论... ..	5
材料和方法.....	13
结果	17
讨论... ..	19
参考文献... ..	25
综述.....	32
参考文献... ..	39
致谢... ..	43

Contents

Abbreviations and Acronyms.....	1
Chinese abstract.....	2
English abstract.....	3
Introduction... ..	5
Materials and methods.....	13
Results	17
Discussion... ..	19
References... ..	25
Review.....	32
References.....	39
Acknowledgements... ..	43

缩 写 词

ASO	Arteriosclerosis obliterans
Arg	Arginase
Arg I	Arginase I
Arg II	Arginase II
CCA-IMT	common carotid intima-media thickness
TC	Total cholesterol
TG	Triglyceride
LDL-C	LDL-cholesterol
HDL-C	HDL-cholesterol
SNP	single nucleotide polymorphism
PCR-RFLP	polymerase chain reaction -restriction fragment length polymorphism
SD	standard deviation
BMI	Body mass index
CTA	CT angiography
DNA	Deoxyribonucleic acid
\bar{X}	mean
M	median
MI	myocardial infarction
P _x	percentile
NS	no significance
OR	odds ratio
CI	confidence interval
TNF	tumor necrosis factor
IL	interleukin
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase

摘要

背景及目的 动脉硬化闭塞症 (ASO) 是外周血管动脉粥样硬化导致组织血流减少血管闭塞的一种疾病。ASO 病因复杂, 涉及遗传和环境诸多因素。据猜测许多基因可能与 ASO 发病有关, 但是各种基因假说缺少证据支持。最近一些研究发现, 精氨酸酶 I (Arg I) 可能与动脉粥样硬化的个体易感性有关。Arg I 编码基因位于 6 号染色体短臂 2 区 3 带 (6q23), 长 11.5kb, 包含 8 个外显子, 编码 322 个氨基酸生成蛋白质。当前有研究发现, 位于启动子序列的 Arg rs2781666 G/T 碱基变异与法裔人群颈动脉内膜中层增厚 (CCA-IMT) 相关。种群背景对基因多态性及疾病都存在影响。因此, 我们通过查询 National Center for Biotechnology Information/single-nucleotide polymorphism (SNP; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) 和 HapMap project (<http://www.hapmap.org>) 相关资料, 根据 Arg I rs2781666G/T 的位置和已知功能, 我们设计了一个病例对照实验。这项实验的目的是研究闽南人群中 Arg I rs2781666G/T 和 ASO 是否存在的相关性。

方法 实验组由 60 个 ASO 患者构成, 对照组包括 82 人。记录实验组和对照组人群相关指标。实验组和对照组禁食后隔夜采集血液。Arg I rs2781666G/T 多态性分析采用 PCR—RFLP 技术。对实验结果进行统计学分析, $p < 0.05$ 时存在统计学意义。

结果 两组人群在年龄、糖尿病发病率、高血压发病率、血脂异常发病率、吸烟率之间的差异有显著统计学意义 ($p < 0.05$)。Arg I rs2781666G/T 基因型频数差异存在统计学意义 ($p < 0.05$)。实验组中的 TC、TG 和 LDL-C 水平明显高于对照组水平。实验组中 HDL-C 水平显著低于对照组水平, 两组之间的差异均有统计学意义 ($p < 0.05$)。实验组和对照组 Arg I rs2781666G/T 基因多态性差异显著不同。实验组中 TT 等位基因频数显著高于对照组 TT 等位基因频数。

结论 闽南人群 Arg I rs2781666G/T 多态性与 ASO 之间存在显著的联系。Arg I rs2781666T 是 ASO 发生的独立的危险因素。

关键词: 动脉硬化闭塞症 (ASO); 精氨酸酶 I; 基因多态性

Abstract

Background & Aims Arteriosclerosis obliterans (ASO) is a disease caused by the blocking of blood flow as a result of arteriosclerosis in the peripheral artery. ASO is a complex condition, resulting from genetic and environmental contributions. Many genes are suspected to be involved in its aetiology. Most, however, the genes theory lack of evidence to support. Some very recent studies support a role for arginase (Arg) I gene as a candidate gene that might modulate individual susceptibility to atherosclerosis. The Arg I gene located on chromosome 6q23, consists of eight exons, has a genomic length of 11.5 kb, and encodes a protein of 322 amino acids. In the current report, Arg rs2781666 G/T located within the 5' promoter sequence has been reported to be associated with common carotid intima-media thickness (CCA-IMT) in French population. Generally speaking, Ethnic background is known to influence gene polymorphism and the disease. So, by combining data from the National Center for Biotechnology Information/ single-nucleotide polymorphism (SNP; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) and the HapMap project (<http://www.hapmap.org>) databases, Arg I rs2781666 G/T were chosen on the basis of their location and putative functionality, we design a case-control study. To our best knowledge, studies regarding the association of Arg I gene polymorphisms with ASO are scarce. The aim of the this study was to investigate the possible association between the Arg I rs2781666 G/T polymorphism and ASO in the southern Fujian population.

Methods 60 patients with ASO and 82 controls were recruited. The clinical features and biochemical characteristics of ASO and control groups are registered. Blood samples were obtained after an overnight fast. The rs2781666 G/T polymorphism of Arg I was determined by PCR-RFLP analysis. The data of this study were examined for Statistical analysis. p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results There were significant differences ($p < 0.05$) in age, and the frequencies of diabetes, hypertension, dyslipidemia, obesity, and cigarette smoking between the MI and control groups. The levels of TC, TG, and LDL-C were significantly higher

and the levels of HDL-C were significantly lower in the ASO group when compared to those in the control group ($p < 0.05$). The Arg I rs2781666 G/T polymorphism differences was significantly between ASO and control groups in our study. The frequency of TT genotypes was significantly higher in the ASO group than the control group.

Conclusion A significant association between rs2781666 G/T polymorphism of Arg I gene and ASO was found in the southern Fujian population. The rs2781666T is independently risk factors which is associated with ASO.

Key words Arteriosclerosis obliterans (ASO); arginase I (Arg I) ; polymorphism

一 绪论

1.1 动脉粥样硬化与动脉硬化闭塞症

动脉粥样硬化是一种主要累及大、中动脉的常见病理改变,受累的动脉壁增厚变硬,失去弹性,管腔狭窄。受累的动脉病变从内膜开始,局部脂质、钙质沉积形成斑块,并有动脉中层的逐渐退变,继发性病变尚有斑块内出血、斑块破裂及局部血栓形成。从早期的脂质沉积到最终管腔狭窄所经历的一系列事件一般需要几十年时间。因此,大多数人动脉斑块形成后并没有相应的临床症状,直至这些斑块病变影响了脏器血供,或者斑块破裂导致内皮下组织暴露,从而导致急性血栓形成或急性血栓栓塞时,患者就会表现出相应的临床症状^[1-5]。动脉粥样硬化病变分布为数个组织器官的动脉同时受累,以冠状动脉和脑动脉罹患最多,下肢动脉病变多于上肢动脉病变。当病变发生在腹主动脉及其远侧的主干动脉时,引起下肢慢性缺血的临床表现,即动脉硬化闭塞症(ASO)。

ASO 的病因尚不清楚,除了血脂异常、高血压病、吸烟、糖尿病、肥胖等动脉粥样硬化的高危因素外,可能与某些特殊的解剖部位血流对动脉壁的慢性机械损伤有关。ASO 患者可无临床症状,也可表现为间歇性跛足、静息痛、肢体坏疽。ASO 的自然病程最终表现为患肢丢失。同时 ASO 罹患者具有较高的脑卒中和心血管死亡的风险,因此对其进行筛选至关重要^[6]。

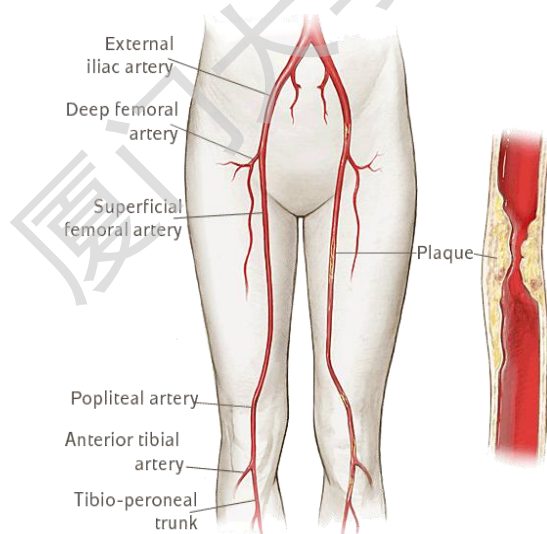


图 1 动脉硬化闭塞症患者下肢血管病变模式图: 内皮损伤, 斑块形成, 管腔狭窄。



图 2 动脉硬化闭塞症患者下肢 CT 动脉造影：闭塞段血管不能显影

1.2 动脉硬化闭塞症的危险因素

尽管当前关于 ASO 病因的研究并不十分清楚，但基于动脉粥样硬化的病理研究进展，一些的危险因素和病理变化的到公认。危险因素基本可以分为环境和遗传两大方面。具体如下^[7]：

血脂异常：高胆固醇和高甘油三酯血症是 ASO 的最主要危险因素。血脂以脂蛋白的形式在血液循环中进行转运，因此高脂血症实际上是高脂蛋白血症。低密度脂蛋白是 ASO 的主要致病因素。极低密度脂蛋白和乳糜微粒也与 AS 发生有密切关系。高密度脂蛋白有抗氧化作用，防止低密度脂蛋白氧化，并可通过竞争机制抑制低密度脂蛋白与血管内皮细胞受体结合而减少其摄取，因此，高密度脂蛋白具有抗 ASO 发病作用。

高血压病：高血压病时血流对血管壁的机械性压力和冲击作用较强；血压能直接影响动脉壁结缔组织代谢；高血压可引起内皮损伤和（或）功能障碍，使内膜对脂质的通透性增加；与高血压发病有关的肾素、儿茶酚胺和血管紧张素等也可改变动脉壁代谢，导致血管内皮损伤，从而造成脂蛋白渗入内膜增多、血小板和单核细胞粘附、中膜平滑肌细胞迁入内膜等变化，促进 ASO 发生和发展。

吸烟和被动吸烟：大量吸烟导致内皮细胞损伤和血内一氧化碳浓度升高，碳氧血红蛋白增多。血中一氧化碳的升高刺激内皮细胞释放生长因子，促使中膜平

滑肌细胞向内膜迁入、增生，参与 ASO 的发生。大量吸烟可使血中低密度脂蛋白易于氧化，氧化低密度脂蛋白有更强的致 ASO 的作用。烟草中含有一种糖蛋白，可激活凝血因子 XII 及某些致突变物质，后者可引起血管壁平滑肌细胞增生。吸烟可以增强血小板聚集功能、升高血中儿茶酚胺浓度及降低高密度脂蛋白水平。这些都有助于 ASO 发生。

糖尿病和高胰岛素血症：与继发性高脂血症有关的疾病。糖尿病患者血中甘油三酯、极低密度脂蛋白水平明显升高，而高密度脂蛋白水平降低，这与 ASO 关系极为密切。高血糖可致低密度脂蛋白糖基化和高甘油三酯血症，促进血单核细胞迁入内膜而转为泡沫细胞。血中胰岛素水平越高，高密度脂蛋白含量越低。

遗传因素：家族性高胆固醇血症、家族性脂蛋白脂酶缺乏症等患者 ASO 的发病率显著高于对照组，提示遗传因素是 ASO 的危险因素。基因多态性在 ASO 发病中的作用也日益受到重视^[8]，最新的报道发现：细胞粘附因子-1 和 E-选择素基因多态性与 ASO 发病相关^[9]。

其它因素：

(1) 年龄：ASO 发生率和病变程度的严重性随年龄增加而增高。年龄是 ASO 的独立危险因素。

(2) 性别：流行病学调查发现 ASO 好发于男性。这与女性绝经前患冠心病几率低于同龄组男性；绝经后两性间发病率差异消失的认识并不相同不相同。

之所以把年龄和性别作为其它因素独立出来是因为年龄和性别是通过流行病学调查等回顾研究发现其是 ASO 的独立危险因素。其中的具体机制并不清楚，年龄作为不可避免的危险因素，不同年龄组别中年龄越高，发病率越高，这似乎用常识就能够解释：年龄越大，动脉粥样硬化越严重。而这又与某些观察到的临床现象不符：60 岁的人罹患严重的 ASO，而 70 岁的人动脉功能良好。性别也是独立的危险因素，但性别本身就与遗传相关，是否存在某些与性染色体基因连锁表达的基因并不能排除。

综上所述，各种危险因素并不是独立发生最终导致了 ASO 发病，而是相互作用、影响，最终通过不同的途径导致 ASO 发病。

1.3 动脉硬化闭塞症的病理机制

以上种种危险因素并不能阐明粥样硬化的确切病理生理发病机制。目前提出的主要病理学因素是脂质、凝血作用、炎症因子以及平滑肌细胞的迁移。尽管各种病理学因素的并没有能够将 ASO 的确切启动因子及随后的分子学机制阐述清楚，但越来越多的强调炎症在 ASO 发病中的作用。

ASO 病变早期，动脉内膜通透性改变，白细胞和血小板粘附性增加，同时释放大量生长因子和细胞粘附因子，促进血管壁平滑肌细胞移位和增殖。同时补体介导的炎症反应被激活，白细胞继续粘附、活化，吞噬氧化的低密度脂蛋白，血管壁平滑肌细胞移位增殖加剧。动脉壁从简单的纤维脂肪变性到复杂的纤维斑块形成，这个过程伴随着纤维化、溃疡、钙化、出血等一系列事件。这些病变的发展是动态的，细胞增殖和凋亡处于平衡，疾病的进展往往需要数十年。当我们发觉炎症反应促进了脂纹向更高级的动脉粥样硬化病变进展时，这种慢性炎症反应在进展到出现明显的临床疾病前可能已经存在数年了。

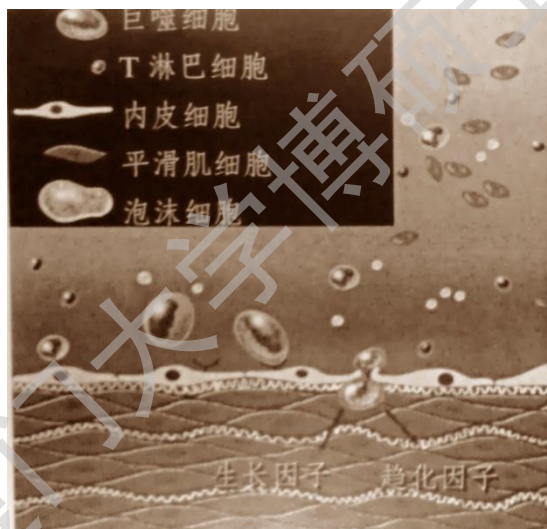
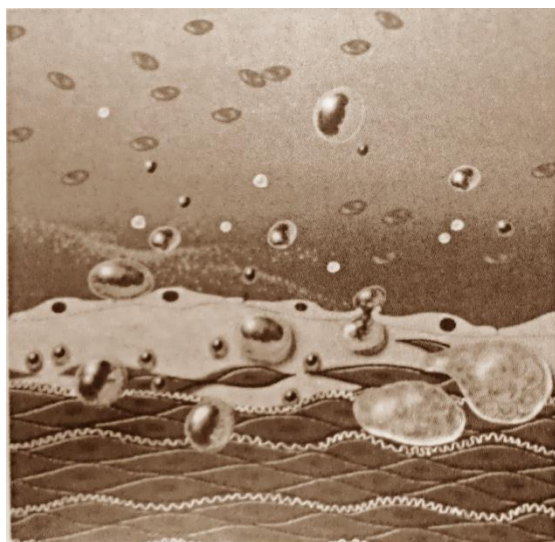
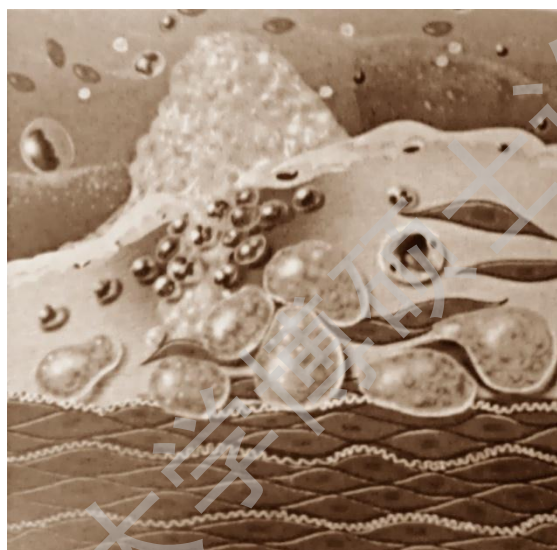


图 3 动脉粥样硬化的病理起始与进展。

(A) 内皮细胞损伤引起内皮细胞功能障碍导致通透性变化，白细胞和血小板粘附性增加，吸引白细胞的细胞因子和生长因子增加，并促进血管壁平滑肌细胞移位和增殖。



(B) 补体激活介导的炎症反应，活化的巨噬细胞吞噬氧化的低密度脂蛋白等事件。



(C) 进展性病变包括纤维量增加、溃疡、钙化和出血。

1.4 动脉粥样硬化与基因多态性

动脉硬化性疾病是由遗传和环境因素共同作用所致的复杂疾病，其发病过程与多基因之间、基因/环境之间的相互作用有关。这些基因单独或连锁表达，还可能与危险因素共同作用而增加疾病发生的机会。基因多态性是指基因组 DNA 中某一特定核苷酸位置上发生转换、颠换、插入或缺失等变化,而且任何一种等位基因在群体中的频率不小于 1%。具有数量多、分布广和稳定遗传等特点。

研究表明, 遗传因素导致了动脉粥样硬化性疾病易感性的个体差异。遗传因

素在所有已知的危险因素中约占 30%-50%。目前, 绝大部分研究都集中在一些已知的基因, 如亚甲基四氢叶酸酯还原酶基因、载脂蛋白基因等。这些基因的多态位点在动脉粥样硬化性疾病中的作用虽已获得公认, 但与疾病的确切关系还没有一致的认识。相关基因研究如下:

亚甲基四氢叶酸酯还原酶:是同型半胱氨酸代谢关键酶之一。同型半胱氨酸主要通过促进血管内皮细胞损伤、血管平滑肌细胞增殖、脂质过氧化和促凝血等机制, 诱导动脉粥样硬化的发生^[10]。McQuillan 等通过研究 1111 个样本亚甲基四氢叶酸酯还原酶的常见变异位点 C667T, 结果发现高同型半胱氨酸血症是颈动脉壁增厚和动脉粥样硬化斑块形成的独立危险因素^[11]。Spotila 等发现亚甲基四氢叶酸酯还原酶基因型对血浆同型半胱氨酸的影响存在年龄依赖的作用^[12]。

载脂蛋白 M:是 Xu 等新近发现的一个新的进化保守的载脂蛋白。它优势表达于高密度脂蛋白(HDL)中, 也可在富含甘油三酯的载脂蛋白及低密度脂蛋白(LDL)中出现^[13]。人类载脂蛋白 M 基因在成熟肝组织和肾组织中专一、强烈表达。Wolfrum 等提出载脂蛋白 M 通过影响前 HDL 的形成, 在 HDL 的代谢过程中起非常重要的调节作用, 进而调节胆固醇代谢以及发挥抗动脉粥样硬化的作用^[14]。Niu 等研究发现, 在汉族人群中载脂蛋白 M 基因启动子区域的 T2778C 位点的变异与 2 型糖尿病的形成密切相关^[15]。

内皮素转化酶 1:内皮素是目前所知的最强的长效缩血管活性多肽, 主要由血管内皮细胞合成, 其通过自分泌、旁分泌或内分泌等作用, 在正常生理活动及血管病变有关疾病的发生发展中起重要作用。内皮素转化酶是内皮素生物合成的关键酶, 在内皮素生物活性调节中起着极为重要的作用。研究发现由于内皮素转化酶基因启动子序列的交替作用从而产生四种异构体。Funke 等研究发现该基因 3 个高度重复的二核苷酸重复片段多态性对启动子区的功能影响很大^[16]。

二甲基精氨酸二甲基氨基水解酶:参与内皮细胞调节的生物分子一氧化氮由内源性一氧化氮合酶合成。非对称性二甲基精氨酸(ADMA)是一种内源性的一氧化氮合酶竞争性抑制剂, 血浆 ADMA 水平升高可抑制一氧化氮的合成, 导致血管内皮功能障碍。因此 ADMA 是一种血管内皮功能失调的危险因子, 也可能是一种动脉粥样硬化发生直接相关的分子。而内皮细胞内 ADMA 浓度的改变又依赖于二甲基精氨酸二甲基氨基水解酶(DDAH)的表达。DDAH 在体内有

DDAH1 和 DDAH2 两种存在方式。最近的研究表明冠心病、糖尿病、高血压病及心力衰竭等患者血浆 ADMA 水平明显升高, 同时一氧化氮活性降低^[17]。在 DDAH2 基因核心启动子 187 位的一个插入 P 缺失突变可以影响 DDAH 的转录水平从而影响血浆 ADMA 水平。该位点多态性增加动脉粥样硬化性疾病的易感性。

1.5 动脉硬化闭塞症与基因多态性

动脉硬化闭塞症 (ASO) 是动脉粥样物质和继发血栓形成导致的动脉管腔狭窄、闭塞性病变^[18]。ASO 以动脉粥样硬化为基本病理改变, 早期为各种刺激因素导致的血管内皮功能紊乱和解剖损伤。这些刺激因素包括各种炎性刺激因子、粘附因子、管壁切应力改变和氧化应激^[19-22]。其流行病学危险因素包括遗传、肥胖、吸烟、高血压、糖尿病、血脂异常等。随着吸烟人数, 高血压、糖尿病、血脂异常患者不断增加^[23], ASO 患者不断增加。有证据显示 60 岁以上人群 ASO 发病率高达 79.9%^[24], 虽然出现病变相关症状的概率较低, 但罹患患者具有较高的脑卒中和心血管疾病死亡风险, 因此对其进行早期筛选有助于减少 ASO 患者罹患心、脑血管疾病的死亡率和致残率^[25]。

除了以上提到的危险因素, 某些遗传学因素似乎也是 ASO 发生的独立危险因素。在临床实践中可以观察到一部分年轻患者 (<55 岁), 他们罹患特别严重的动脉硬化病变, 而与一般人群相比, 他们的直系亲属一般都有很高的无症状 ASO 发病率^[26], 这些观察间接地应正了这样一个假设: 某些遗传因子在 ASO 的发病中起着作用。但遗憾的是, 具体是哪些遗传因子与 ASO 发病相关并不清楚。

基因多态性是指基因组 DNA 中某一特定核苷酸位置上发生转换、颠换、插入或缺失等变化, 而且任何一种等位基因在群体中的频率不小于 1%。具有数量多、分布广和稳定遗传等特点。它与许多疾病直接相关, 如血友病和苯酮尿病等, 是决定人类疾病易感性和药物反应差异的主要因素。

当前比较公认的观点认为 ASO 是一种与基因多态性密切相关的疾病, 目前人类基因组中已发现近 40 个与动脉粥样硬化性疾病相关的基因位点, 这些研究成果不仅揭示动脉粥样硬化的分子机制, 也为此类疾病的药物研发提供了新的靶点^[27]。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库